

BASES MOLECULARES DE ALFA-TALASEMIA EN LA ARGENTINA

KAREN G. SCHEPS¹, LILIANA FRANCIANE², ABIGAIL NASH², GLORIA E. CERRONE¹,
SILVIA B. COPELLI¹, VIVIANA VARELA¹

¹Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, INIGEM, CONICET-UBA, ²División Genética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Resumen La α -talasemia, es uno de los desórdenes hereditarios más frecuentes mundialmente. Al presente, el diagnóstico molecular es la única herramienta que permite el diagnóstico certero. El propósito de este trabajo fue caracterizar las bases moleculares de estos síndromes en nuestro medio, y establecer relaciones genotipo-fenotipo. Mediante la complementación de distintas técnicas de biología molecular e hibridación fluorescente *in situ* (FISH), se logró poner en evidencia la presencia de mutaciones α -talasémicas en 145 de 184 (78.8%) pacientes estudiados con perfil hematológico compatible con α -talasemia. Dentro de este grupo, las deleciones correspondieron al defecto genético más frecuente, prevaleciendo la mutación $-\alpha^{3,7}$ en genotipos heterocigotas y homocigotas. Asimismo, en pacientes con fenotipo α^0 las deleciones prevalentes fueron $-\text{MED}$ y $-\text{CAL/CAMP}$. Este estudio permitió también describir una deleción de la región sub-telomérica en un paciente con α -talasemia y retraso mental. En el 7.6% de los pacientes caracterizados clínicamente como posibles α -talasémicos (microcitosis con valores de Hb A₂ inferiores al 3.5%), se hallaron mutaciones β -talasémicas en estado heterocigota. Se lograron establecer perfiles hematológicos asociados a los genotipos α^+ y α^0 para pacientes adultos y niños. Esperamos que este trabajo pueda servir como guía para reconocer posibles portadores α -talasémicos. También permite destacar el trabajo en conjunto de médicos hematólogos, el laboratorio (bioquímico y de biología molecular) y de los médicos genetistas, con el fin de proporcionar adecuado consejo genético.

Palabras clave: alfa-talasemia, genética, deleción, mutación puntual, biología molecular

Abstract *Molecular bases of α -thalassemia in Argentina.* The α -thalassemia is one of the most common hereditary disorders worldwide. Currently, molecular diagnostics is the only available tool to achieve an accurate diagnosis. The purpose of this study was to characterize the molecular bases of these syndromes in our environment and to establish genotype-phenotype associations. Through a combination of different molecular techniques and fluorescent *in situ* hybridization (FISH), we were able to find α -thalassemic mutations in 145 of the 184 patients (78.8%) studied with hematological parameters compatible with α -thalassemia. Deletions of the α -globin genes resulted the major molecular cause of the disease, and the most frequent mutation was $-\alpha^{3,7}$, found in homozygous and heterozygous genotypes. In patients with α^0 phenotypes, other prevalent mutations were $-\text{MED}$ and $-\text{CAL/CAMP}$. The description of a sub-telomeric deletion in a patient with α -thalassemia and mental retardation was also achieved. β -thalassemic mutations in heterozygous state were found in 7.6% of the patients, who presented α -thalassemic clinical features (microcytosis and Hb A₂ levels below 3.5%). Hematologic profiles for the α^+ and α^0 genotypes were established for adult and pediatric patients. Hopefully, this work will provide guidelines for the detection of possible α -thalassemic carriers. It also highlights the collaborative work of hematologists, the biochemical and molecular biology laboratory and genetists, in order to provide appropriate genetic counseling.

Key words: alpha-thalassemia, genetics, deletion, puntual mutation, molecular biology

La α -talasemia (α -tal) (OMIM 604131; HBA2: 141850, HBA1: 141800) es uno de los desórdenes genéticos monogénicos más comunes a nivel mundial. Se estima que el 5% de la población mundial es portadora de alguna mutación α -tal¹. Prevalece en regiones tropicales

y sub-tropicales (el sub-Sahara africano, Mediterráneo, Oriente Medio, el subcontinente indio y el sudeste de Asia²), coexistiendo en regiones donde está difundida la malaria, que ejerció una presión evolutiva positiva sobre las mutaciones α -tal. Cabe destacar que en varias zonas de China y del sudeste asiático, el 40% de la población es portadora de alelos α -tal³.

Los genes HBA2 y HBA1, que codifican las cadenas de α -globina, se encuentran en la región telomérica del brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3); en el *cluster* (o familia de genes) de α -globina que incluye: el gen embrionario HBZ, el pseudogen HBZP, el gen HBM, el pseudogen HBAP1, los genes HBA2 y HBA1 y HBQ1.

Recibido: 29-IX-2014

Aceptado: 12-I-2015

Dirección postal: Prof. Dr. Viviana Varela, Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4964-8296 e-mail: vvarela@ffyb.uba.ar

La expresión tejido-específica de los genes del *cluster* alcanza altos niveles a través de interacciones de largo alcance entre secuencias distales regulatorias y los promotores. Los elementos distales se encuentran altamente conservados evolutivamente, razón por la cual se los conoce como MCS (*Multispecies Conserved Sequences*) o MRE (*Major Regulatory Element*) por su rol en la transcripción. A pesar de existir 4 secuencias MCS (-R1 a -R4), la única secuencia que hasta el momento demostró cumplir el verdadero rol de *enhancer* es MCS-R2, también conocida como HS-40, por ubicarse a 40 kb corriente arriba del *cluster*.

Los síndromes α -tal presentan gran heterogeneidad fenotípica, producto de la diversidad de sus bases moleculares. La causa más frecuente de las α -tal son las deleciones, con la pérdida de una ($-\alpha$) o ambas ($--$) copias de los genes *HBA* de un mismo cromosoma. En función del número de genes afectados, los portadores α -tal se clasifican en: "portador silente", con 3 copias de *HBA* funcionantes (genotipo $-\alpha/\alpha$) clínicamente normal y que raramente cursa con anemia, aunque exhibe ciertas alteraciones en el hemograma, el portador con "rasgo talasémico", que posee 2 copias funcionantes de genes que codifican para α -globina (genotipos $-\alpha/\alpha$ o $--/\alpha$) y dos presentaciones clínicamente relevantes: la enfermedad de hemoglobina (Hb) H, (genotipo $-\alpha/--$) y el síndrome de hidropesía fetal por Hb Bart, (genotipo $--/--$)⁴. En la enfermedad de la Hb H, el exceso de cadenas β , forman homotetrámeros (β_4) que, a medida que maduran los glóbulos rojos, precipitan formando cuerpos de inclusión. En estos individuos, los efectos clínicos de la anemia son exacerbados porque los tetrámeros β_4 no pueden ceder oxígeno a los tejidos⁵. Las manifestaciones clínicas más importantes son la anemia hemolítica, que puede llegar al requerimiento de transfusiones, hepatoesplenomegalia e ictericia. También pueden presentar modificaciones óseas producto de eritropoyesis extra-medular.

El síndrome de hidropesía fetal por Hb Bart es la condición más grave y es fundamentalmente incompatible con la vida extrauterina, ya que los individuos afectados son incapaces de producir Hb F, Hb A o Hb A₂; es relativamente común en el sudeste asiático y es menos frecuente en la población de origen mediterráneo.

Se describieron además, formas no clásicas de presentación de α -tal asociada a retraso mental y α -tal adquirida en síndromes mielodisplásicos. Dentro de los pacientes con retraso mental, que en general cursan con enfermedad de Hb H, existen 2 grupos de pacientes: el primero, con retraso mental relativamente leve, variedad de dismorfias y retraso en el desarrollo, es catalogado como síndrome ATR 16. A nivel molecular corresponde a un síndrome de deleción contiguo en la región telomérica del brazo corto del cromosoma 16, generalmente esporádico, que conduce a la pérdida de los genes del *cluster* de α -globina y genes adyacentes; hasta el momento no se pudo esclarecer cuáles están involucrados en esta condición⁶. El segundo grupo de pacientes presenta alteraciones clínicas graves con compromiso neurológico (relativamente uniformes: signos dismórficos característicos como hipertelorismo, puente nasal deprimido, narinas antevertidas, boca grande en carpa, anomalías genitales,

hipotonía y retraso mental grave, debido a mutaciones a nivel germinal en el gen *ATRX*. La α -tal asociada a los síndromes mielodisplásicos también se atribuye a mutaciones adquiridas en el gen *ATRX*⁷.

Las deleciones que afectan el *cluster* α presentan un patrón de distribución geográfica definido. Prevalecen las que provocan la pérdida de una sola copia de gen α (del α^+) y son producto de *crossing-over* desigual entre regiones de alta homología en el *cluster* de α -globina. La de mayor frecuencia a nivel mundial es la deleción $-\alpha^{3.7}$ o *rightward deletion* (deleción de 3.7 kb) que predomina en el área del Mediterráneo, África y Asia. La deleción $-\alpha^{4.2}$ o *leftward deletion* (deleción de 4.2 kb) es menos frecuente y prevalece en el sudeste asiático⁸.

Hay descritas más de 40 deleciones α^{04} , con la pérdida de ambas copias de genes *HBA* y que pueden incluir otros genes del *cluster*. Las más frecuentes son $--^{MEDI}$ y $-(\alpha)^{20.5}$ en población del Mediterráneo, $--^{SEA}$ en el sudeste de Asia, y $--^{FIL}$ en población filipina.

Con menor frecuencia, las bases moleculares de las α -tal están asociadas a mutaciones puntuales o no delecionales. Prevalecen las alteraciones en el gen *HBA2* ($\alpha^M\alpha$) sobre el gen *HBA1* ($\alpha\alpha^M$)⁸, aunque es posible que exista un sub-diagnóstico de alteraciones en el último gen. Las más frecuentes en el área del Mediterráneo son $\alpha^{NcoI}\alpha$ (*HBA2:c.2T>C*: cambio ATG > ACG en el codón de iniciación) y $\alpha^{IVS1(-5nt)}\alpha$ (*HBA2:c.95+2_95+6delTGAGG*: eliminación de 5 nucleótidos en la secuencia dadora de *splicing* del intrón 1 de *HBA2*). Se han informado otras mutaciones: alteraciones en la señal de poliadenilación, descritas en el Mediterráneo y Oriente Medio, y en el codón de terminación que conducen a variantes elongadas de Hb, como Hbs *Constant Spring*, *Icaria*, *Koya Dora*, y *Seal Rock Paksé*, descritas en el área del Mediterráneo y en Asia⁹.

Los desórdenes hereditarios que afectan la síntesis normal de Hb son comunes en Argentina, siendo la β -tal la alteración más frecuente y mejor caracterizada¹⁰⁻¹². No obstante, los patrones migratorios están cambiando dramáticamente la distribución geográfica mundial de α -tal, al punto de incluirse en el panel de *screening* neonatal obligatorio en el estado de California y contemplarse su inclusión a nivel nacional en EE.UU.¹³.

Al presente, el diagnóstico molecular es la única herramienta que permite el diagnóstico certero y la diferenciación de anemias causadas por otras etiologías. No existen marcadores clínicos o hematológicos confirmatorios de α -tal y la información reportada sobre las bases moleculares de estos síndromes en nuestro medio es escasa y parcial^{14, 15}.

El propósito de este trabajo fue caracterizar las alteraciones genéticas en el *cluster* de α -globina asociadas a fenotipos compatibles con α -tal y establecer la relación entre el genotipo y el fenotipo hematológico.

Materiales y métodos

Se derivaron para análisis molecular, a nuestro laboratorio, 184 pacientes con fenotipo hematológico compatible con α -tal. Previo a los estudios, los pacientes firmaron un consentimiento informado que contempla la Declaración de Helsinki de la

Asociación Médica Mundial. Se purificó el ADN genómico de leucocitos de sangre periférica por el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)¹⁶. La estrategia de estudio molecular comprendió, en principio, la detección e identificación de las deleciones $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--\text{MEDI}$, $-(\alpha)^{20.5}$, $--\text{SEA}$ y $--\text{FIL}$ por PCR GAP¹⁷. Se diseñaron *primers* para la detección de la deleción $--\text{SPAN}$ por PCR GAP y para la búsqueda de otras deleciones se utilizó la técnica de *Multiplex ligation-dependent-probe-amplification* (MLPA) mediante el kit "SALSA MLPA probemix P140-B4 HBA", MRC-Holland.

En los pacientes en que no se hallaron deleciones, se estudió la presencia de mutaciones puntuales, en *HBA2* y *HBA1*. Se amplificaron diferencialmente los genes *HBA2* y *HBA1* con *primers* específicos¹⁸. Las mutaciones $\alpha^{\text{NcoI}}\alpha$ y $\alpha^{\text{IvSI}(-5\text{nt})}\alpha$ se estudiaron por PCR y posterior digestión enzimática. Otras variaciones de secuencia se identificaron por secuenciación automática en un ABI PRISM™ 3130XL (*Applied Biosystems*, Seoul, Korea). Cuando se encontraron mutaciones puntuales no descritas previamente, se caracterizaron por clonado con el sistema *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega, Madison, WI, USA), transformación de bacterias *Escherichia coli* DH5 α y secuenciación de los clones obtenidos. En un grupo de pacientes se estudió el gen *HBB* por PCR y secuenciación con los *primers* HBB1-F and HBB2-R¹⁰ y los *primers* L3 5'-GGGTACAGTTTAGAATGGG-3' y HBB4-R: 5'-TAGCTGTTTGCAGCCTCACCTT-3' diseñados en nuestro laboratorio (*PrimerQuest®*, IDT, Coralville, USA). Los análisis bioinformáticos de las secuencias se realizaron con los programas Finch-TV Version 1.4.0 (Geospiza Inc., USA), ChromasPro 1.32 (Technelysium, PtyLtd, Australia) y BLAST¹⁹.

La información sobre las mutaciones estudiadas se obtuvo a partir de la base de datos "A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias" (<http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/menu.html>), y del *GenBank* se tomó la secuencia normal de referencia de los genes (*HBA*: NC_000016.10 y *HBB*: NC_000011.10).

Las diferencias entre los valores hematimétricos de los distintos grupos se analizaron mediante *One-way ANOVA* y el *test post-hoc* de comparaciones múltiples de Bonferroni realizados con *GraphPadPrism* version 5.03 para Windows, *GraphPad Software* (San Diego California USA, www.graphpad.com).

Resultados

En 145 pacientes se hallaron mutaciones α -tal, responsables del fenotipo clínico-hematológico. En la Tabla 1 se enumeran las distintas mutaciones halladas y su distribución. La deleción $-\alpha^{3.7}$ es la que presentó mayor frecuencia siendo la principal responsable, tanto del fenotipo "portador silente" (genotipo $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), como del "rasgo talasémico" (genotipo $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$).

Se encontraron distintas mutaciones α^0 en estado heterocigota: la deleción $--\text{MEDI}$ resultó ser la más frecuente en pacientes con ascendencia mediterránea, y la deleción $--\text{SEA}$ en los de origen asiático. La mutación $--\text{MEDI}$ se halló también asociada a la deleción $-\alpha^{3.7}$ en un paciente con enfermedad de Hb H.

En 13 pacientes, con fenotipo compatible con α^0 -tal, en que no se pudieron caracterizar las mutaciones por las estrategias antes mencionadas (11 con fenotipo de "rasgo talasémico" y 2 con Hb H, positivos para la deleción $-\alpha^{3.7}$), se realizó el análisis por MLPA (amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación). Por medio de esta técnica se pudo confirmar una alteración en el *cluster* de

TABLA 1.— Distribución de las mutaciones α -tal halladas en los pacientes estudiados

Genotipo	Nº pacientes	Nº familias
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	79	96
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	25	
$\alpha^{\text{M}}/\alpha\alpha$	8	8
$\alpha^{\text{M}}/\alpha\alpha$	5	3
$--\text{MEDI}/\alpha\alpha$	7	6
$-(\alpha)^{20.5}/\alpha\alpha$	2	2
$--\text{SEA}/\alpha\alpha$	7	5
$--\text{FIL}/\alpha\alpha$	2	1
Deleción--(*)/ $\alpha\alpha$	5	4
Deleción--(*)/ $\alpha\alpha$	1	1
Deleción HS-40(*)/ $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	1	1
$--\text{MEDI}/-\alpha^{3.7}$	1	1
$--(*)/-\alpha^{3.7}$	2	2

Las deleciones indicadas como (*) fueron caracterizadas por MLPA: (*): $--\text{CAL}$ o $--\text{CAMPANIA}$; (*): deleción entre 10.2 y 14.2 kb; (*): deleción entre 0.1 y 89.6 kb; (*): deleción mayor a 127.5 kb.

α -globina como el defecto responsable del fenotipo en 9 pacientes. En 5 de ellos (4 familias) se determinó la presencia de una deleción que comprende entre 28.9 y 36.5 kilo-pares de bases (kb), que sería compatible con las deleciones $--\text{CAL}$ (cuyos límites fueron actualizados recientemente²⁰) o $--\text{CAMPANIA}$ ²¹, muy similares en tamaño y ambas caracterizadas en población del Mediterráneo. En un paciente se identificó una deleción cuyos bordes no coincidirían con otras deleciones previamente descritas, con un tamaño entre 10.2 y 14.2 kb, que involucra la pérdida de ambos genes *HBA*. En otro se observó la deleción de la región regulatoria HS-40 de entre 0.1 y 89.6 kb en uno de sus alelos, mientras que sus 4 copias de genes *HBA* permanecieron intactas. En los 2 pacientes con Hb H en los que únicamente se había identificado la deleción $-\alpha^{3.7}$, el análisis por MLPA reveló la presencia de grandes deleciones (mayores a 127.5 kb) que abarcaron todas las sondas incluidas en el kit. Uno de estos pacientes presentó, además de la α -tal, retraso mental y anomalías en el desarrollo. Los restantes 4 pacientes, con fenotipo compatible con α^0 -tal, no presentaron deleciones ni inserciones por MLPA. En la Fig. 1 se esquematizan los resultados obtenidos por MLPA.

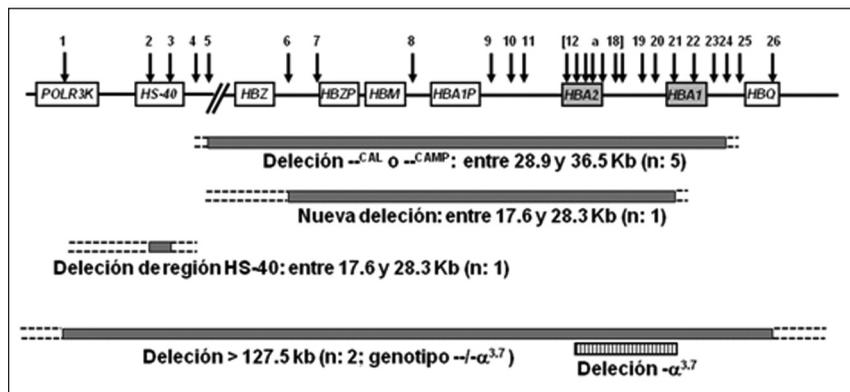
En los pacientes en que no se hallaron deleciones, se estudió la presencia de mutaciones puntuales en *HBA2* y *HBA1*. En 8 familias se hallaron mutaciones en estado heterocigota en el gen *HBA2*: 5 presentaron la mutación $\alpha^{\text{IvSI}(-5\text{nt})}\alpha$, 2 la $\alpha^{\text{NcoI}}\alpha$ y, en uno, una variante de secuencia en la región 3' UTR, *HBA2*:c.*107. Estos hallazgos son compatibles con el perfil étnico de nuestra población, de ascendencia predominante del área del Mediterráneo. En 3 familias, se hallaron mutaciones en el gen *HBA1* previamente no descritas: en una paciente adulta se determinó una sustitución en la secuencia aceptora de *splicing*,

HBA1:c.301-2A>T, que se detectó en *cis* con el cambio que da lugar a la Hb Riccarton²². Por otra parte, se encontraron dos deleciones noveles que generan corrimientos del marco de lectura: *HBA1:c.187delG* (p.W62fsX66), en una mujer con anemia drepanocítica y su hijo portador de Hb S, en asociación con la variante *patchwork* $\alpha 212^{23}$ y la mutación *HBA1:c.237deIC* (p.Asn78Lysfs*6) en un padre y su hijo, de la última familia.

En la población estudiada no se encontraron las mutaciones $-\alpha^{4,2}$, $-\alpha^{SPAN}$, ni otras mutaciones no delecionales.

A partir de los resultados obtenidos, se correlacionaron las mutaciones halladas con los parámetros hematológicos. En la Tabla 2 se presentan los resultados hallados para el recuento de glóbulos rojos (Rto.GR), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y Hb A₂. Los pacientes se agruparon de

acuerdo a su genotipo, sexo y rango etario, con el fin de evaluar si existían diferencias significativas en los valores entre estos grupos. Tanto para el VCM como el HCM, en el genotipo $-\alpha/\alpha\alpha$ no existen diferencias significativas entre hombres y mujeres adultos, pero sí entre pacientes adultos y niños, mientras que en los genotipos $-\alpha/-\alpha$ y $-/-\alpha\alpha$ no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos. Para el recuento de glóbulos rojos no se observaron diferencias significativas entre los grupos para el genotipo $-\alpha/\alpha\alpha$, pero en el caso de los pacientes con deleción de 2 copias de genes *HBA*, los hombres presentaron valores significativamente más elevados que las mujeres y que los niños. El análisis de los valores de Hb A₂ arrojó resultados similares a los observados para el VCM y el HCM, con la salvedad de que los valores remitidos fueron obtenidos por distintos laboratorios, por



Las flechas indican la posición de las 26 sondas incluidas en el kit de MLPA. Las diferentes deleciones observadas en pacientes se indican como barras grises; las líneas punteadas marcan las regiones de los posibles puntos de corte de la deleción. En los 2 pacientes con Hb H (genotipo $-/-\alpha^{3,7}$), se indican las 2 deleciones: la deleción caracterizada por MLPA que se extendió a lo largo de las 26 sondas (barras grises) y la deleción $-\alpha^{3,7}$ (barras verticales). n: número de pacientes en los que se encontraron las mutaciones

Fig. 1.- Esquema de las deleciones caracterizadas por *Multiplex ligation-dependent-probe-amplification* (MLPA)

TABLA 2.- Relación entre los genotipos α -tal y los parámetros hematimétricos

Genotipo	Rto.GR (10 ⁶ /mm ³)	VCM (fl)	HCM (pg)	Hb A2 (%)
$-\alpha/\alpha\alpha$				
Hombres				
n = 12	5.17 ± 1.02	79.07 ± 2.56	25.81 ± 1.11	2.56 ± 0.31
Mujeres				
n = 26	4.75 ± 0.33	77.42 ± 3.15	24.84 ± 1.30	2.61 ± 0.33
Niños				
n = 10	5.01 ± 0.42	71.41 ± 4.93	22.64 ± 1.27	2.14 ± 0.28
$-/-\alpha\alpha$ y				
Hombres				
n = 6	6.16 ± 0.24	66.17 ± 3.23	20.13 ± 1.33	2.17 ± 0.26
Mujeres				
$-\alpha/-\alpha$				
n = 16	5.38 ± 0.55	67.02 ± 4.03	20.91 ± 1.11	2.21 ± 0.41
Niños				
n = 18	5.32 ± 0.37	67.16 ± 2.90	20.99 ± 1.38	2.26 ± 0.44

VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media. Se indican media ± desvío estándar para cada parámetro.

lo que la diferencia significativa entre adultos y niños con el grupo $-\alpha/\alpha\alpha$ podría ser atribuida a esta causa.

Al comparar el VCM y HCM entre los distintos genotipos (en este caso se incluyeron las mutaciones puntuales, sin discriminar entre el gen afectado y sin ajuste por sexo y edad), se hallaron diferencias significativas en los valores presentados por los distintos genotipos ($-\alpha/\alpha\alpha$, portadores de mutaciones puntuales y de doble delección).

Los valores de VCM arrojaron diferencias significativas para los distintos genotipos ($-\alpha/\alpha\alpha$, portadores de mutaciones puntuales o de delección de dos copias de genes *HBA*). No se registraron diferencias significativas, únicamente entre los niños con delección de una copia de gen *HBA* y aquellos que presentaron mutaciones puntuales.

En el análisis de la HCM, los resultados fueron bastante similares a los del VCM, excepto que tampoco en adultos se verificaron diferencias significativas en los valores de los portadores del genotipo $-\alpha/\alpha\alpha$ y de mutaciones puntuales. Las tendencias en los valores analizados se representan en la Fig. 2.

En un grupo de 14 pacientes en los que no se encontraron mutaciones con $Hb A_2 \leq 3.5\%$ (rango de 2.4% a 3.4%) y $VCM < 75$ fl, se secuenció el gen *HBB* y se identificaron mutaciones β -tal en estado heterocigota, siendo IVS 1-6 (T > C) la responsable del cuadro clínico-hematológico en la mitad de los casos (el resto de las mutaciones fueron Codón 39 (C > T), IVS 1-110 (G > A) y (-87) (C > G). Solo un paciente presentó niveles de Hb F mayores al 2.0%, que podrían justificar una menor producción de Hb A_2 .

En 25 pacientes (13.6% de los casos), 11 con fenotipo compatible con α^+ -tal y 14 con α^0 -tal, hasta el momento no se halló el defecto primario y continúan en estudio.

Discusión

Los resultados obtenidos muestran que la delección $-\alpha^{3.7}$ es la más frecuente en nuestro medio, al igual que lo

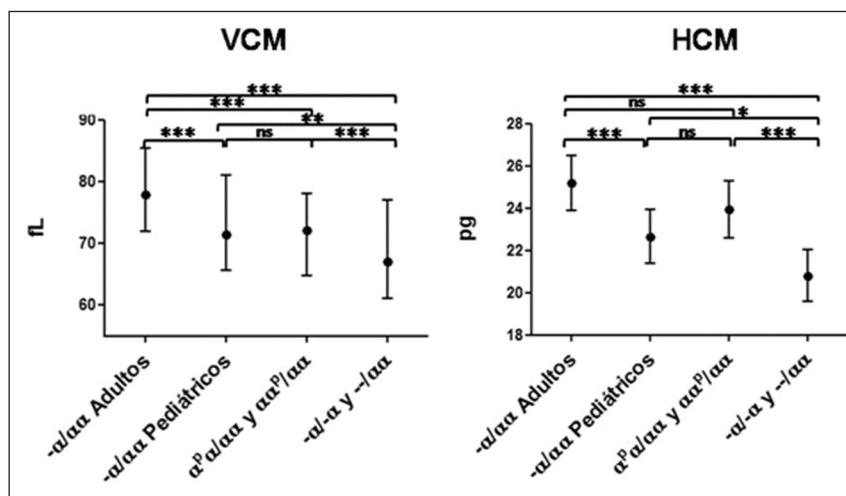
descrito en la mayoría de las poblaciones analizadas. Esto implica que ante la sospecha de α -tal, ésta debe ser la primera mutación a identificar. En pacientes con “rasgo talasémico”, negativo para la delección $-\alpha^{3.7}$, es importante conocer su ascendencia debido a que las mutaciones $--_{MEDI}$ y $-(\alpha)^{20.5}$, solo fueron halladas en individuos con ascendencia mediterránea, y las delecciones $--_{SEA}$ y $--_{FIL}$, en individuos de origen asiático.

A partir del estudio por MLPA se observó en 5 pacientes (4 familias genéticamente no relacionadas), de ascendencia mediterránea, el mismo patrón de delección (compatible con $--_{CAL}$ o $--_{CAMPANIA}$) lo que convertiría a esta alteración en la tercera mutación más frecuente en nuestra población, luego de las delecciones $-\alpha^{3.7}$ y $--_{MEDI}$. Actualmente estamos trabajando para establecer los límites de esta delección, y diseñar un ensayo directo para su identificación.

La delección de la región regulatoria MCS-R2 (HS-40) tiene la misma repercusión en el fenotipo hematológico que la pérdida de 2 copias de *HBA*, resaltando la importancia de la presencia de esta región para la expresión en niveles apropiados de los genes del *cluster* α .

En las familias tipificadas, las mutaciones puntuales representaron el 8.5% del defecto genético responsable; el hecho de haber descrito 3 mutaciones noveles en *HBA1* destaca la importancia de incluir la secuenciación de los genes *HBA* en el estudio de pacientes con fenotipos α -tal en los que se descartaron las delecciones y mutaciones puntuales más frecuentes.

De las formas clínicamente relevantes de α -tal, solo ingresaron para su estudio 3 pacientes con Hb H y, hasta el momento, no registramos hidropesía fetal por Hb Bart en la población estudiada. Este panorama podría cambiar debido a un incremento en la inmigración asiática de las últimas décadas, que presenta mayor prevalencia de rasgo α -tal y bases genéticas diferentes. En los 3 pacientes con Hb H, ninguno de ascendencia oriental, se determinó que la base molecular correspondía a la



Valores de VCM y HCM están indicados como media \pm DS. Análisis estadístico comparativo de VCM y HCM de los distintos grupos por ANOVA de una vía y test post-hoc de Bonferroni (GraphPadPrism versión 5.03). Valores de significancia: *** $p = 0.001$; ** $p = 0.01$; * $p = 0.05$; ns: no significativo.

Fig 2.– Comparación de VCM y HCM entre los distintos grupos

delección de 3 copias de *HBA*: en un caso el genotipo fue $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{MEDI}$ y en los otros dos, $-\alpha^{3.7}/delección \geq 127.5$ kb (delección caracterizada por MLPA). El hallazgo del defecto molecular en las Hb H es de suma importancia, ya que en los pacientes que presentan una mutación puntual, el cuadro suele ser más grave²⁴.

En el paciente con Hb H y retraso mental asociado, se realizó un estudio de cariotipo, en el que no se visualizaron alteraciones, y un estudio de FISH, en el que pudo ponerse en evidencia la delección subtelomérica. La presencia de esta delección del *cluster* de α -globina y genes adyacentes podría estar asociada o contribuir al fenotipo observado. Este caso demuestra la importancia de la búsqueda de delecciones crípticas en pacientes con retraso mental, y reitera la necesidad del estudio molecular en pacientes en que el retraso se presente con anemia microcítica e hipocrómica con niveles de hierro normales.

Es interesante destacar el porcentaje de pacientes que presentaron mutaciones β -tal y fueron derivados con diagnóstico presuntivo de α -tal. El hecho de que en el 50% de los casos la mutación responsable fue IVS 1-6 (mutación tipo β^+ leve) indicaría que el déficit de cadenas de β -globina, producto de esta alteración, no siempre sería lo suficientemente importante como para inducir aumentos de Hb A₂ mayores a 3.5%. Otra observación destacable es que ninguna de las muestras en las que se hallaron mutaciones α -tal presentó niveles de Hb A₂ mayores al 3.0%.

Las mutaciones α -tal presentan perfiles hematológicos definidos: el recuento de glóbulos rojos es mayor o igual a $4.5 \times 10^6/\text{mm}^3$, el VCM suele ser menor a 80 fL y la HCM es menor a 27 pg . Asimismo, se distinguen perfiles distintos para las mutaciones α^+ y α^0 , que pueden orientar al diagnóstico; estos hallazgos demuestran que la clave para la detección y caracterización exitosa de las hemoglobinopatías, en particular las talasemias, es la minuciosa recolección inicial de los datos clínico-hematológicos de los pacientes. Finalmente, los resultados obtenidos destacan la importancia del diagnóstico molecular como herramienta fundamental para establecer un diagnóstico definitivo de estos cuadros, y el correcto asesoramiento genético-familiar.

Agradecimientos: Este trabajo fue parcialmente financiado con el subsidio 20020120200092BA otorgado por la Universidad de Buenos Aires (Programación Científica 2013-2015). Agradecemos a los pacientes y los médicos hematólogos que depositaron su confianza en nuestro trabajo.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

- Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Curr Mol Med* 2008; 8: 592-9.
- Higgs DR, Weatherall DJ. The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 1154-62.
- Vichinsky E. Advances in the treatment of alpha-thalassemia. *Blood Rev* 2012; 26 Suppl 1: S31-4.
- Galanello R, Cao A. Gene test review. Alpha-thalassemia. *Genet Med* 2011; 13: 83-8.
- Olivieri NF, Weatherall DJ. Thalassaemias. In: RJ Arcesi, IM Hann, OP Smith (eds) *Pediatric Hematology*. 3rd ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. 2006, p 281-301.
- Higgs DR. The molecular basis of α -thalassaemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3:a011718.doi: 10.1101/cshperspect.a011718.
- Galanello R, Cao A. Gene test review. Alpha-thalassemia. *Genet Med* 2011; 13: 83-8.
- Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 28: 5-13.
- Higgs DR. The molecular basis of alpha-thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Watherall DJ (eds); *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management*. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2009, p 241-65.
- Rossetti LC, Targovnik HM, Varela V. The molecular basis of β -thalassaemia in Argentina. Influence of the immigration pattern from the Mediterranean Basin. *Haematologica* 2004; 89: 746-7.
- Rossetti LC, Scheps KG, Binaghi A, Abreu MS, Mansilla MT, Varela V. Diagnóstico molecular de mutaciones beta talasémicas, genotipos complejos. *Hematología Argentina* 2010; 14: 41-7.
- Torres FA, Bonduel M, Sciuccati G, et al. B Talasemia mayor en Argentina. *Medicina (B Aires)* 2002; 62: 124-34.
- Michlitsch J, Azimi M, Hoppe C, et al. Newborn screening for hemoglobinopathies in California. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52: 486-90.
- Noguera NI, Bragós IM, Milani AC. Prevalence of $-\alpha$ 3.7-thalassemia in Argentina. *Hemoglobin* 2002; 26: 103-6.
- Bragós IM, Noguera NI, Raviola MP, Milani AC. Triplication ($/\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ anti β 3.7) or deletion ($-\alpha$ 3.7) association in Argentinian beta-thalassaemic carriers. *Ann Hematol* 2003; 82: 696-8.
- Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 1980; 8: 4321-5.
- Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 2001; 98: 250-1.
- Jorge SB, Melo MB, Costa FF, Sonati MF. Screening for mutations in human alpha-globin genes by nonradioactive single-strand conformation polymorphism. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 1471-4.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.
- Blattner A, Brunner-Agten S, Ludin K, et al. Detection of germ-line rearrangements in patients with α - and β -thalassaemia using high resolution array CGH. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 51: 39-47.
- Sessa R, Puzone S, Ammirabile M, et al. Identification and molecular characterization of the $-\alpha^{CAMPANIA}$ deletion, a novel α^0 -thalassaemic defect, in two unrelated Italian families. *Am J Haem* 2010; 85: 143-4.
- Scheps KG, Binaghi A, Varela V. Identification of a new HBA1 gene mutation (HBA1:c.301-2A>T) in cis with HbRiccarrton (HBA1:c.154G>A) [α 51(CE9)Gly \rightarrow Ser]. *Hemoglobin* 2012; 36: 504-7.
- Scheps KG, De Paula SM, Bitsman AR, et al. Coinheritance of a novel mutation on the HBA1 gene: c.187delG(p.W62fsX66) [codon 62 (-G) (α 1)] with the α 212 patchwork allele and Hb S [β 6(A3)Glu \rightarrow Val, GAG>GTG; HBB: c.20A>T]. *Hemoglobin* 2013; 37: 492-500.
- Vichinsky EP. Clinical manifestations of α -thalassaemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3: a011742.